

(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 7  
 A01H 1/00

(45) 공고일자 2002년10월18일  
 (11) 등록번호 10-0357422  
 (24) 등록일자 2002년10월07일

(21) 출원번호	10-2001-0005550	(65) 공개번호	특2001-0089155
(22) 출원일자	2001년02월06일	(43) 공개일자	2001년09월29일

(30) 우선권주장 1020000011550 2000년03월08일 대한민국(KR)

(73) 특허권자 주식회사 이즈텍  
 경북 경산시 하양읍 금락1리 330번지

(72) 발명자 정일경  
 대구 수성구 사월동 보성아파트 102동 1805호  
 유종상  
 경기도성남시수정구태평1동5345번지  
 김명희  
 대구광역시수성구범물동보성타운203동503호  
 허병주  
 경상북도경주시양북면어일1리1295-176  
 정일선  
 경상북도청송군현동면창양리125번지

(74) 대리인 김석현

심사관 : 권오희

(54) 식물의 자가불화합성을 조절하는 방법

요약

본 발명은 자가불화합성 조절제 조성물, 식물의 자가불화합성 제어방법 및 상기 방법을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물에 관한 것으로 구체적으로, 자가불화합성을 조절하는 화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는 저해제로 황산염 특히,  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 를 포함하는 자가불화합성 조절제 조성물; 상기 자가불화합성 조절제 조성물을 이용하는 식물의 자가불화합성 제어방법; 및 상기 제어방법을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물에 관한 것이다. 본 발명의 자가불화합성 조절제를 이용하면 단일 품종의 과실수에서 별도의 수분수를 재배하지 않고도 자기화분에 의해 수정이 되어 열매를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 결실율이 증가되어 단위 면적당 생산량을 극대화 할 수 있다.

대표도

## 도 5

색인어

자가불화합성, 화주조직-특이적 RNase, 황산염

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 후지사과의 뿌리, 잎, 줄기, 꽃잎, 꽃받침 및 화주로부터 분리한 RNase가 효모(yeast)의 리보솜 RNA(ribosomal RNA)를 분해하는 활성을 보여주는 RNase 활성 염색(RNase activity staining) 결과를 나타낸 것이고,

→: 화주조직-특이적 RNase의 활성을 나타내는 밴드

도 2는 재배종 사과 품종인 홍로, 홍옥, 후지, 국광 및 쓰가루의 화주조직으로부터 분리한 총 단백질을 은 염색법(Silver staining)으로 나타낸 것이고,

→: 후지사과 유전형질-특이적 RNase의 활성을 나타내는 밴드

M : 표준 분자량 지표

도 3은 후지사과의 화분관 신장이 화주조직-특이적 RNase를 포함하는 화분관 신장 배지에서 억제되는 결과를 나타낸 현미경 사진이고,

A : RNase 무처리 B : RNase 2 유닛(unit) 처리

C : RNase 4 유닛(unit) 처리 D : RNase 6 유닛(unit) 처리

도 4는 후지사과의 화주에서 분리·정제한 화주조직-특이적 S1 및 S2 RNase 효소활성을 저해하는 화학물질들의 저해 정도를 나타낸 그래프이고,

도 5는 후지사과의 화분관이 화주조직-특이적 RNase 및 화주조직-특이적 RNase의 저해제 조성물을 포함하는 화분관 신장 배지에서 신장되는 결과를 나타내는 현미경 사진이고,

A : 1 mM ZnSO<sub>4</sub> + RNase 10 유닛 처리B : 2 mM ZnSO<sub>4</sub> + RNase 10 유닛 처리C : 5 mM ZnSO<sub>4</sub> + RNase 10 유닛 처리D : 1 mM CuSO<sub>4</sub> + RNase 10 유닛 처리E : 2 mM CuSO<sub>4</sub> + RNase 10 유닛 처리F : 5 mM CuSO<sub>4</sub> + RNase 10 유닛 처리

도 6a는 본 발명의 화주조직-특이적 RNase 저해제 조성물을 자연계에서 자가불화합성인 야생종 토마토에 처리하기 전 개화초기의 야생종 토마토를 나타낸 것이고,

도 6b는 본 발명의 화주조직-특이적 RNase 저해제 조성물을 자연계에서 자가불화합성인 야생종 토마토에 처리한 후 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 결과를 나타낸 것이고,

도 7a는 본 발명의 화주조직-특이적 RNase 저해제 조성물을 자연계에서 자가불화합성인 후지사과에 처리하기 전 개화초기의 후지사과를 나타낸 것이다.

도 7b는 본 발명의 화주조직-특이적 RNase 저해제 조성물을 자연계에서 자가불화합성인 후지사과에 처리한 후 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 결과를 나타낸 것이다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 발명의 목적

##### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 자가불화합성 조절제 조성물, 식물의 자가불화합성 제어방법 및 상기 방법을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물에 관한 것으로 구체적으로, 자가불화합성을 조절하는 화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는 저해제로 황산염 특히,  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 를 포함하는 자가불화합성 조절제 조성물; 상기 자가불화합성 조절제 조성물을 이용하여 식물의 자가불화합성 제어방법; 및 상기 제어방법을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물에 관한 것이다.

이 지구상에 반 이상의 식물은 자가불화합성의 성질을 가지고 있으며 상기 자가불화합성이란 자기화분으로 수정되지 않는 성질을 의미한다. 그러므로, 이러한 자가불화합성 식물들은 유전적으로 다른 형질의 화분으로만 수정이 가능하다. 즉, 자가불화합성을 나타내는 대부분의 식물들은 결실을 이루기 위하여 다른 품종의 꽃가루로 수분되어야만 하므로, 이러한 자가불화합성의 성질을 갖는 식물은 한 가지 품종만 존재하게 될 경우에 꽂은 피어도 열매를 맺지 못한다.

한편, 자가불화합성 식물의 경우에 다른 품종간의 자연적인 수분은 꿀벌 및 꽃등에 등과 같은 방화곤충 또는 바람에 의해서 매개된다. 그러나, 최근에는 농약의 과다사용과 급격한 산업화에 따른 환경오염 등으로 인하여 방화곤충의 수가 급격히 감소하고 있으며, 방화곤충과 수분수가 충분하다고 하더라도 매년 개화기에 발생하는 저온현상, 강풍 및 강우등과 같은 기상환경의 장해요인으로 인해 방화곤충의 활동이 어려운 경우에는 안정된 결실율을 확보하기가 어렵다.

더욱이, 경제성이 높은 단일 품종만을 재배하는 농가에서는 수분수가 부족하기 때문에 자연적인 결실율이 더 감소하게 된다.

따라서, 자연 결실율만으로는 작물의 결실 안정성과 과실의 품질향상을 도모하기 어렵기 때문에 최근에는 수입한 꽃가루를 이용하여 인공수분을 실시하거나 외국에서 수입한 머리뿔가위벌 등의 방화곤충을 인공으로 사육하여 개화기에 방사하는 방법을 이용하고 있다. 특히, 인공수분의 경우 방화곤충이 아닌 사람이 직접 수분수 품종의 꽃가루를 화주의 주두에 묻혀주는 방법을 이용하기 때문에 많은 노동력과 비용이 소요되어 경제적으로 적합하지 못하다.

자연상태의 과수류, 일부 화훼류, 일부 약용식물 및 가지과 채소들은 생식조직인 암술내에서 화주조직-특이적 RNase가 분비된다. 한편, 상기 RNase의 경우 각 품종마다 유전형질이 다른 RNase가 화주조직에 존재하며 그 기작은 자기화분이 암술의 화주조직으로부터 자방을 향해 신장할 때, 화주조직-특이적 RNase가 분비되어 자기화분의 rRNA만을 선택적으로 분해한다고 알려져 있다(McClure 등, Nature, 1991). 이로 인해 화분관 신장은 암술의 일정한 위치인 1/3 지점에서 파괴되어 화분관이 자방까지 신장되지 못하여 결국에는 자기화분에 의한 수정이 이루어지지 않아 과실의 결실도 이루지 못하게 된다.

한편, 현재까지 진행되어진 연구에 의하면 화주조직에서 분비되는 RNase는 자기 또는 비자기 화분 내부에 비선택적으로 들어가게 되지만 상기 RNase에 특이적으로 반응하는 자기화분내의 억제인자(inhibitor) 또는 수용체(receptor)의 작용과 연결되게 된다. 이러한 작용은 선택적으로 자기화분의 rRNA만을 분해하는 신호전달과정으로 연결되고 결국 자기화분일 경우에는 화분관이 자방에 도달하기 전에 파괴되어 수정이 이루어지지 않는 것으로 추측되고 있다.

이와는 달리, 방화곤충 또는 바람에 의해 매개된 다른 유전형질을 갖는 수분수에서 유래한 비자기 화분은 화분관을 정상적으로 신장시킨다. 이러한 현상은 현재까지 알려진 연구결과에 따른 가설에 의하면 다른 형질의 화분에 존재하는 암술(화주)조직에서 분비되는 RNase를 수용하는 수용체의 구조가 자기형질의 것과 일치되지 않아서 이후의 신호전달과정이 연결되지 못하게 되고 결국 비자기 화분의 rRNA는 RNase의 공격을 받지 않게 됨으로써 화분관의 신장이 정상적으로 유도되어 수정이 가능하게 된다고 보고되고 있다.

그러나, 아직 화분족의 억제인자(inhibitor)나 수용체 분자(receptor molecule)에 대해서는 세계 각국의 연구진들에 의해 활발한 연구가 진행되고 있으나 명확한 실마리를 찾지 못하고 있으며, 다만 혼미경상의 면역학적인 방법으로 관찰한 결과 화주조직에서 분비되는 RNase가 화분관의 신장조직 내부에서도 발견된다는 보고가 있을 뿐이다.

한편, 사과, 배, 커피 및 아몬드 등의 과수류, 일부 화훼류, 일부 약용식물, 야생종 토마토, 가지, 담배, 감자 등과 같은 가지과 채소들의 자가불화합성은 암술(화주조직)-특이적이면서 유전자-특이적인 RNase에 의해 수정이 조절된다고 보고되어 있다(정일경 등, Plant Molecular Biology, 26:757-762, 1994; 정일경 등, 한국육종학회지 29(1):41-46, 1997; 정일경 등, Journal of Plant Physiology, 154:63-70, 1999).

이와 관련하여 본 발명자는 자가불화합성을 조절하는 화주조직-특이적 RNase를 야생종 토마토에서 1992년에 세계에서 최초로 분리하여 보고한 바 있으며(정일경 등, Bioscience Biotechnology Biochemistry, 57(7):1172-1176, 1993; 일본 특허출원 제 1,262,865호), 토마토 및 맥문동과 같은 식물의 자가불화합성에 관여하는 유전자들을 규명한 바 있다(정일경 등, Plant Molecular Biology, 26:757-762, 1994; 정일경 등, Plant Cell Physiology, 36(8):1621-1627, 1995; 일본 특허출원 제 7-187557호).

이에 본 발명자들은 상기와 같은 자가불화합성 식물의 문제를 해결하기 위하여, 화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는 저해제를 발견하고 상기 저해제를 이용하여 자가불화합성을 조절하는 자가불화합성 제어방법 및 자기화분에 의해 수정된 식물을 제공함으로써 과수류 등의 식물이 자기화분에 의해 수분 또는 과일의 결실이 이루어지도록 조작하여 양질의 과실을 확보할 수 있을 뿐만 아니라 경제적으로도 우수한 영농법을 제시하게 되었다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 자연계에서 배우자체형 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수분되어 결실을 맺음으로써 별도의 수분수를 재배하지 않고도 자기 화분에 의해 수정이 이루어져 열매를 맺을 수 있을 뿐만 아니라, 결실율이 증가되어 단위 면적당 생산량을 극대화시킬 수 있는 화주조직-특이적인 RNase의 활성 저해제 조성물에 관한 것이다.

#### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자가불화합성을 조절하는 화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는 물질을 포함하는 자가불화합성 조절제 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 자가불화합성 조절제 조성물을 이용하여 식물의 자가불화합성 제어방법을 제공한다.

아울러, 본 발명은 상기 제어방법을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 자가불화합성을 조절하는 화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는 물질을 포함하는 자가불화합성 조절제 조성물을 제공한다.

본 발명자는 상기의 연구결과들을 응용하여 자가불화합성과 관련된 화주조직-특이적인 RNase의 저해제를 발견하여 자연계에 존재하는 식물의 자가불화합성을 제어함으로써 자기화분에 의한 수정을 유도하고자 하였다.

먼저, 본 발명자는 후지사과의 생식조직인 화주조직에서 자가불화합성을 일으키는데 결정적인 역할을 하는 RNase를 순수 분리 및 정제하였다(표 2참조). 또한, 후지사과의 뿌리, 잎, 줄기, 꽃잎 및 꽃받침으로부터 RNase를 분리하여 화주조직에서 분리된 RNase와 함께 전기영동한 후 RNase 활성 염색을 함으로써 화주조직에서 분리된 RNase가 화주조직-특이적인 RNase 임을 확인하였다(도 1참조). 아울러, 사과 품종에 따른 화주조직-특이적 RNase의 차이를 조사하기 위하여, 흥로, 흥옥, 후지, 국광 및 쓰가루의 화주조직으로부터 RNase를 분리·정제한 후 RNase 활성 염색과 은 염색을 통하여 화주조직-특이적 RNase가 종마다 종류가 다른 것을 확인하였다(도 2참조).

상기 후지사과의 화주조직-특이적 RNase가 자가불화합성을 조절하는 것을 확인하기 위하여, 인공적으로 화분으로부터 화분관의 신장을 유도할 수 있는 화분관 신장 배지(Willi Jahnens 등, Plant Cell, (1):501-510, 1989년 5월; Harris 등, Plant Physiology, 189:360-367, 1989)에 상기 화주조직-특이적 RNase를 첨가하여 후지사과의 화분관 신장 양상을 관찰하였다(도 3참조). 그 결과 화주조직-특이적 RNase가 화분관 신장을 억제함으로써 자가불화합성을 조절하는 것을 확인할 수 있었다.

본 발명자는 본 발명에서 제시하는 독창적인 실험방법을 이용하여 상기 화분관 신장 배지에 후지사과의 화주조직-특이적 RNase와 여러 화학물질들을 첨가하여 후지사과의 화분관 신장 양상을 관찰하였다(도 4 및 도 5참조). 그 결과, 자기 화분의 화분관 신장을 억제하는 RNase 활성이  $\text{CuSO}_4$  또는  $\text{ZnSO}_4$ 에 의해 효과적으로 저해됨으로써 화분관이 정상적으로 신장되었으며, 이로부터  $\text{Cu}^{2+}$  이온이 결합된 무기염 또는  $\text{Zn}^{2+}$  이온이 결합된 무기염이 상기 RNase 활성을 저해하는 저해제임을 밝혀냈다. 이와 같이 상기  $\text{Cu}^{2+}$  이온이 결합된 무기염 또는  $\text{Zn}^{2+}$  이온이 결합된 무기염은 자가불화합성 조절제 조성물로 작용하며, 본 발명에 따른 자가불화합성 조절제 조성물로 사용될 수 있는  $\text{Cu}^{2+}$  이온이 결합된 무기염 또는  $\text{Zn}^{2+}$  이온이 결합된 무기염의 음이온은 상기 황산 이온과 같은 강산의 음이온, 보다 바람직하게는 황산, 질산, 과염소산, 과브롬산, 과요오드산, 염산, 브롬산 및 요오드산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 강산의 음이온인 것 이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 자가불화합성 조절제 조성물을 이용하여 식물의 자가불화합성 제어방법을 제공한다.

상기 화분관 신장 배지를 이용한 실험결과를 토대로, 본 발명자는 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물에 의한 자가 불화합성 타파효과를 실제 포장에서 생육하는 자가불화합성 작물인 야생종 토마토 및 후지사과를 대상으로 실험하였다.

먼저, 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물을 처리하는 시기를 결정하기 위하여, 야생종 토마토에는 개화 7일 전부터 만개 2일 후까지 1 mM의  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 를 처리하였고, 후지사과에는 개화 5일 전부터 만개 2일 후까지 1 mM의  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 를 처리하여 자가수분율을 조사하였다. 그 결과 야생종 토마토는 개화초기인 개화 7일 전부터 개화 4일 전까지 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물을 처리시 70% 이상의 결실율을 나타냈고, 후지사과 또한 개화초기인 개화 5일 전부터 개화 3일 전까지 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물을 처리시 70% 이상의 결실율을 나타냈다. 따라서, 화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는 물질을 포함하는 자가불화합성 조절제 조성물을 특정시기에 살포하는 방법으로 식물의 배우자체형 자가불화합성을 제어할 수 있으며, 상기 자가불화합성 조절제 조성물을 처리하는 시기는 식물 생육의 특정시기인 꽃봉오리 형성기부터 만개(滿開) 전인 개화초기가 바람직하다.

또한, 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물의 적당한 처리농도를 조사하기 위하여 야생종 토마토 및 후지사과에  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 를 0~1,500 ppm으로 개화 초기에 처리하여 약해(藥害) 유무 및 결실율을 조사하였다(도 6 및 도 7참조). 실제 과실수 재배시 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물을 전착제와 혼합하여 처리함으로써 자가불화합성 조절제 조성물의 흡수 효율을 증가시킬 수 있으므로, 상기  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 를 전착제와 혼합하여 일정시기 즉, 개화초기에 과실수에 살포하는 방법으로 처리하였다.

그 결과 처리된  $\text{CuSO}_4$  및  $\text{ZnSO}_4$ 의 일정 농도에서 야생종 토마토와 후지사과에서 약해없이 자기화분에 의해 수정된 과실 및 식물체를 얻을 수 있었다. 이로부터 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제 조성물이 종(種)에 관계없이 그 효과를 나타낼 수 있으며, 개화 초기에 처리하는  $\text{CuSO}_4$ 의 바람직한 농도는 100~700 ppm으로 나타났으며  $\text{ZnSO}_4$ 의 바람직한 농도는 100~800 ppm으로 나타났다. 또한, 본 발명의 자가불화합성 저해제 조성물을 전착제의 제조 사별 권장사용량과 혼합하여 과실수에 살포함으로써 약해없이 매우 높은 수분율을 확보할 수 있었다. 상기 전착제로는 헥사코나졸(hexaconazole)계, 실록세인(siloxane)계 및 알킬아릴 폴리에톡실산(alkylaryl polyethoxylate)계 전착제가 높은 수분율 확보에 바람직하다. 구체적으로 상기 전착제는, 농약공업협회 발간 농약사용지침서(1998)에 기재된 바와 같이, 식물의 종류에 따라 0.0335~0.05%의 농도로 식물에 처리하는 것이 바람직하다.

본 발명의 자가불화합성 저해제 조성물의 바람직한 적정농도를 표 1에 나타냈다.

< 표 1

#### 화주조직-특이적 RNase의 저해제 유효성분의 적정농도

[표 1]

유효성분 농도	CuSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
저해효과를 보이는 최저농도(ppm)	100	100
약해가 나타나지 않는 최고농도(ppm)	700	800

상기표 1의 화주조직-특이적 RNase의 저해제로서 CuSO<sub>4</sub>를 유효성분으로 이용할 경우 100 ppm 이하로 사용될 경우 RNase 활성을 적절하게 저해시키지 못하기 때문에 70% 이상의 안정된 결실율을 확보하기가 어려우며 반면에, 700 ppm 이상으로 사용될 경우 약해의 피해를 유발할 수 있기 때문에 경제적으로 적합하지 못하다. 또한, 화주조직-특이적 RNase의 저해제로서 ZnSO<sub>4</sub>를 유효성분으로 이용할 경우 역시 100 ppm 이하에서는 RNase 활성을 적절하게 저해시키지 못하여 70% 이상의 안정된 결실율을 확보하기가 어려우며 반면에, 800 ppm 이상의 고농도를 사용할 경우 약해의 피해를 입을 수 있어 경제적으로 적합하지 못하다.

아울러, 본 발명은 상기 제어방법을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물을 제공한다.

상기의 결과와 같이 본 발명의 자가불화합성 조절제 조성물을 이용하여 자가불화합성이 타파되어 자기화분에 의해 수정된 식물을 얻을 수 있다. 본 발명의 자가불화합성 제어방법을 이용할 수 있는 식물의 예로는 실시예에서 사용한 후지사과 및 야생종 토마토 이외에 사과, 배, 커피 및 아몬드 등의 과수류 또는 화훼류, 약용식물, 토마토, 가지, 담배, 감자 등과 같은 가지과 채소가 있다.

이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### < 실시예 1 자가불화합성 조절 단백질인 화주조직-특이적 RNase의 분리·정제

##### < 1-1 후지사과의 각 조직으로부터 RNase의 분리·정제

후지사과의 화주, 뿌리, 잎, 줄기, 꽃잎 및 꽃받침 조직으로부터 RNase를 분리하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

후지사과 화주조직 1 g에 10 mM 인산나트륨(pH 6.0), 10 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1%[W/V] 폴리비닐 피로딘(polyvinyl pyrrolidine)으로 구성된 완충용액을 첨가하여 막자사발로 파쇄하여 조단백질을 추출하였다. 추출한 조단백질을 40% 황산암모늄으로 농축시킨 후 반투과성막(제한범위: 분자량 12,000 Da 이하)을 이용하여 5 mM 인산나트륨 완충용액에서 투석하였다. 그 결과 RNase 활성이 강한 분획을 얻었으며 이 때 RNase의 총 활성도는 295,000 유닛(unit)이었다.

상기 RNase 활성이 강한 분획으로 Bio-gel P-60(영국 Bio-Rad사 제품) 수지로 층진된 칼럼을 이용한 젤여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography)를 수행하였다(Harris 등, Plant Physiology, 89:360-367, 1989; Anuradha Singh 등, Plant Physiology, 96:61-68, 1991; Shihshie 등, Plant Cell, 6:1021-1028, 1994). 상기 RNase 활성이 강한 분획을 500  $\mu$ l 씩 1.5 cm/시의 속도로 4°C에서 상기 칼럼에 흡착시킨 후 0.5 M 염화나트륨 50 mM 인산나트륨으로 구성된 완충용액으로 RNase를 동일한 조건으로 용출시켰다.

상기 젤여과 크로마토그래피의 결과 분자량 23~25 kDa인 화주조직에서 특이적으로 발현되는 RNase 1,282,000 unit을 회수하였다.

또한, 후지사과의 뿌리, 잎, 줄기, 꽃잎 및 꽃받침 조직으로부터 상기와 동일한 방법으로 각각 20~30 kDa의 RNase를 분리·정제하였다.

#### < 1-2 후지사과 각 조직으로부터 분리·정제한 RNase의 활성 염색

후지사과의 각 조직에서 발현되는 RNase의 조직 특이성을 조사하기 위하여, 상기 실시예 1-1에서 분리·정제한 각 조직의 RNase를 4°C에서 15% 폴리아크릴아마이드 젤(polyacrylamide gel)에 전기영동한 후 전기영동한 젤을 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4)로 구성된 완충용액에 넣고 효모의 리보솜 RNA(ribosomal RNA, 미국 Sigma사 제품) 300 µg/ml을 기질로 첨가하여 37°C에서 120분간 효소 반응을 수행하였다.

도 1의 활성 염색 결과로부터 화주, 뿌리, 잎, 줄기, 꽃잎 및 꽃받침의 RNase는 부위에 따라 분자량의 종류가 다른 것을 확인할 수 있었고 화주조직에서 분리한 RNase는 화주조직-특이적인 RNase임을 확인할 수 있었다.

#### < 1-3 사과 품종에 따른 화주조직-특이적인 RNase 조사

사과 품종에 따라 화주조직-특이적 RNase의 종류가 다른지 조사하기 위하여 먼저, 재배종인 홍로, 홍옥, 후지, 국광 및 쓰가루의 화주 조직으로부터 실시예 1-1과 동일한 방법으로 RNase를 분리·정제한 후 하기와 같은 방법으로 RNase의 활성 염색 및 은 염색을 수행하였다.

각각의 품종에서 분리·정제한 RNase를 실시예 1-2와 동일한 방법으로 RNase의 활성 염색을 하였다. 또한, 상기 RNase를 15% 폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동한 후 은 염색(Giulian G. G. 등, Anal. Biochem., 129, 1983)을 하여도 2에 나타냈다.

그 결과 사과 품종에 따라 분자량이 서로 다른 화주조직 특이적인 RNase가 존재하였고 이로부터 수분수와 수분수로부터 화분을 받아들이는 과실수에는 유전형질-특이적인 RNase가 발현되는 것을 알 수 있었다.

#### < 1-4 화주조직-특이적인 RNase의 고순도 정제

실시예 1-1에서 분리·정제한 후지사과의 화주조직-특이적인 RNase를 고순도로 정제하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 상기 화주조직-특이적인 RNase를 센트리콘-10(Centricon-10, Millipore)으로 농축시킨 후 모노-S 칼럼(Mono-S column, Amersham-Pharmacia)과 FPLC 시스템(Bio-Rad)을 이용한 양이온-교환 크로마토그래피를 수행하여 더욱 높은 순도로 정제하였다. 상기 칼럼에 흡착된 단백질을 1.0 ml/분의 유속으로 0.5 M 염화나트륨, 50 mM 인산나트륨(pH 6.0)으로 구성된 완충용액을 이용하여 용출시켰다.

그 결과 강한 활성을 나타내는 2종류의 S1 RNase 분획과 S2 RNase 분획이 회수되었다. 이러한 2종류의 RNase 분획물은 재배종 과실수종인 후지사과가 유전형질적으로 이형접합체(heterozygote)로 2종류의 화주조직-특이적 RNase가 존재하기 때문이다. 상기 회수된 RNase들은 분자량 및 등전점이 각각 다르며 정제 프로필을 표 2에 정리하였다(S: Self-incompatibility의 약자).

#### < 표 2

#### 화주조직-특이적 RNase 정제과정의 각 단계별 효소활성도 프로필

[표 2]

	전체 단백질 양( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	총 활성 <sup>a</sup> (unit)	특이적 활성 <sup>b</sup> (unit)	효율(%)
조추출액	7.52	1,282,000	34.10	100
40% 황산암모늄	1.25	295,000	157.33	22
Biogel P-60겔여과	0.047	10,350	880.85	18
FPLC(Mono S) S1S2	0.016	136	8,500	10
	0.019	114	6,000	14

a: 전체 단백질 양에 대한 활성의 합계(전체 단백질 양  $\times$  unit)

b: 총 활성에 대해 전체 단백질 양으로 나누어준 값(총 활성  $\div$  전체 단백질 양)

상기표 2에 정리한 바와 같이, 효소 총 활성은 S1 RNase와 S2 RNase가 각각 136 유닛과 114 유닛이었으며 또한, 특이적 활성은 S1 RNase와 S2 RNase가 각각 8,500 유닛과 6,000 유닛이었다. 정제 효율은 조단백질을 100% 기준으로 정하여 계산하였을 때 S1 RNase와 S2 RNase가 각각 10%와 14%이었다. 이로부터 후지사과의 화주조직-특이적 RNase가 고순도로 정제되었음을 알 수 있다.

#### < 실시예 2 후지사과의 화주조직-특이적 RNase에 의한 자기화분의 화분관 신장 억

상기 실시예 1-4에서 정제된 화주조직-특이적 S1RNase가 자기화분의 화분관 신장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저, 후지사과 수술에서 만들어지는 자기화분만을 분리하였다. 분리된 화분을 실시예 1-4에서 정제된 S1 RNase를 각각  $0, 2, 4, 6$  유닛( $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )으로 첨가한 화분관 신장배지에서  $28^\circ\text{C}$ 에서 2~4시간 동안 암(暗)조건으로 자기화분을 배양하였다. 상기 화분관 신장배지는  $20 \text{ mM Mes-KOH}(\text{pH } 6.0), 0.07\% \text{ C a}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}, 0.02\% \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}, 0.01\% \text{ KNO}_3, 0.01\% \text{ H}_3\text{BO}_3$  및 2% 수크로스로 구성되어 있으며 화분관을 인공적으로 신장시킨다.

상기 화분관 신장 양상 실험결과를도 3에서 살펴보면, 화주조직-특이적 S1RNase가 첨가되지 않은 대조구(A)와 비교했을 때 화주조직-특이적 S1RNase를 2, 4, 6 유닛으로 첨가한 경우(B,C 및 D)에 자기화분의 화분관 신장이 억제되었다. 이로부터 자가불화합성을 유발하는 결정적인 인자가 화주조직-특이적 RNase라는 사실을 확인할 수 있었다.

#### < 실시예 3 화주조직-특이적 RNase 활성의 저해제 조사

상기 실시예 1-4에서 정제된 화주조직-특이적 S1 RNase 및 S2 RNase에 단백질 분해효소의 저해제로 작용하는 화학물질들을 첨가하여 상기 RNase의 활성 변화를 조사하였다. 일반적인 RNase 활성 측진제들, 시판증인 RNase 활성 저해제들 및 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제 후보물질들을 첨가하여 RNase 활성을 측정하였다(Singh A. 등, *Plant Physiology*, 96:61-68, 1991). 그 중 저해제의 대표적인 물질인 단백질 분해효소 억제제인 EDTA, RNase 활성 측진제인  $\text{CaCl}_2$ , 시판증인 RNase 활성 저해제로 맹독성 물질인 DEPC(Sigma), 화주조직-특이적 RNase 저해제 후보물질인  $\text{ZnSO}_4$  및  $\text{CuSO}_4$ 를 각각  $1 \text{ mM}$ 로 첨가하여 측정한 RNase 활성 결과를도 4에 나타내었다.

그 결과 상기 화주조직-특이적 RNase의 활성은  $1 \text{ mM ZnSO}_4$ (약 288 ppm)와  $1 \text{ mM CuSO}_4$ (약 250 ppm)를 각각 첨가하였을 때 인산 완충용액에서의 RNase의 활성(대조구) 100%와 비교하여 15% 이하로 현저하게 저해되었다. DEPC와 같은 시판증인 RNase 활성 저해제 또한 화주조직-특이적 RNase에 대하여 활성 저해효과가 탁월하였으나 이들은 맹독성 물질로서 농작물에 사용할 때 큰 제한을 받고 있다. 이로부터  $\text{ZnSO}_4$ 와  $\text{CuSO}_4$ 가 화주조직-특이적 RNase의 활성을 효과적으로 저해하는 물질임이 판명되었다.

#### < 실시예 4 화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리에 의한 자기화분의 화분관 신장

상기 실시예 3에서 화주조직-특이적 RNase의 저해제로 판명된 ZnSO<sub>4</sub> 및 CuSO<sub>4</sub>가 자기화분의 화분관 신장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다. 상기 화주조직-특이적 S1 RNase 10 유닛(mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>)을 화분관 신장배지에 첨가하고 1 mM, 2 mM, 5 mM의 ZnSO<sub>4</sub>와 1 mM, 2 mM, 5 mM의 CuSO<sub>4</sub>를 각각 첨가하여 실시예 2와 동일한 방법으로 화분관을 배양하였다.

도 5의 화분관 신장 양상 결과로부터 화분관의 신장을 억제하는 RNase의 활성이 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 2 mM ZnSO<sub>4</sub>와 1 mM CuSO<sub>4</sub> 첨가로 인하여 극복되어 화분관이 다시 신장하게 되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이로부터 ZnSO<sub>4</sub> 및 CuSO<sub>4</sub>가 화주조직-특이적 RNase 활성의 효과적인 저해제임이 확인되었다.

< 실시예 5 야생종 토마토에서 화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리시기 결정, 결실율 및 약해 조사

< 5-1 화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리시기 결정

본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제 효과를 실제 포장에서 실험하기 위하여, 연구용 온실(대한민국 경상북도 경산시 대구가톨릭대학교 소재)에서 재배되고 있는 야생종 토마토에 본 발명의 화주조직-특이적 RNase를 처리하였다. 야생종 토마토는 자연계에서 대표적인 자가불화합성 식물이며 유전적으로 단일품종만을 유지시키는 환경조건을 유지하면서 실험을 수행하였다.

본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리시기를 결정하기 위하여, 개화초기(꽃봉오리 형성기~만개(滿開) 전), 개화중기(만개시), 개화말기(만개 1일 후~화기 탈락기)에 상기 저해제를 처리하였다. 식물의 수분이 활발히 이루어지는 시간대인 오전 9시~11시 사이에 상기 저해제 ZnSO<sub>4</sub>는 1 mM(약 288 ppm)로 첨가하였고 CuSO<sub>4</sub>는 1 mM(약 250 ppm)로 처리하였다. 결실율을 조사하고 각 실험에서 25개 화기(사과의 수술, 암술조직, 꽃잎 등을 포함한 생식조직)에 대한 4회 반복 실험의 결과를 표 3에 통계값으로 나타내었다.

< 표 3

화주조직-특이적 RNase의 저해제가 처리된 야생종 토마토의 화기 형성기별 결실율

[표 3]

개화시기		ZnSO <sub>4</sub> 1 mM 처리시 결실율	CuSO <sub>4</sub> 1 mM 처리시 결실율
초기	개화 7일 전	92%	91%
	개화 6일 전	90%	91%
	개화 5일 전	83%	86%
	개화 4일 전	71%	74%
	개화 3일 전	30%	37%
	개화 2일 전	0	0
	개화 1일 전	0	0
중기	만개	0	0
말기	만개 1일 후	0	0
	만개 2일 후	0	0

상기표 3의 결과에서 알 수 있듯이, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제를 화기형성 초기(만개 4일~7일 전)에 처리하였을 때 70% 이상의 자기화분에 의한 결실율을 확보할 수 있었다.

< 5-2 화주조직-특이적 RNase의 저해제의 농도 변화에 따른 결실율 및 약해 조사

화주조직-특이적 RNase의 저해제의 농도에 따른 결실율 및 약해를 조사하기 위하여, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제인 ZnSO<sub>4</sub>와 CuSO<sub>4</sub>를 농도별로 야생종 토마토에 만개 4일전에 처리하였다.

또한, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제의 과일 결실 조절제로서의 효능을 극대화시키기 위하여, ZnSO<sub>4</sub> 또는 CuSO<sub>4</sub>를 시판중인 혼사코나졸(hexaconazole)계, 실록세인(siloxane)계 및 알킬아릴 폴리에톡실산(alkylaryl polyethoxylate)계 전착제를 제조회사별 권장사용양(최적사용양)에 맞게 혼합하여 처리하였다.

## &lt; 표 4

## 야생종 토마토에 대한 화주조직-특이적 RNase의 저해제 농도변화에 따른 결실율 및 약해 조사

[ 표 4 ]

유효성분 농도 (ppm)	ZnSO <sub>4</sub> 농도변화에 따른 결실율 및 약해 유무		CuSO <sub>4</sub> 농도변화에 따른 결실율 및 약해 유무	
	결실율(%)	약해	결실율(%)	약해
0	0	무	0	무
20	0	무	0	무
40	13	무	15	무
60	31	무	41	무
80	61	무	59	무
100	99	무	97	무
200	98	무	92	무
300	93	무	88	무
400	88	무	85	무
500	85	무	77	무
600	84	무	73	무
700	74	무	73	무
800	71	무	44	소
900	62	미약	16	소
1000	0	소	7	소
1100	0	소	0	소
1200	0	소	0	극심
1300	0	극심	0	극심
1400	0	극심	0	극심
1500	0	극심	0	극심

상기 표 4에서는 실록세인(siloxane)계 전착제(상품명: 실루엣, 대한민국 동부정밀화학사)를 0.0335%로 혼합한 조성물을 제조하여 처리한 후 자기화분에 의한 결실율을 조사하였으며, 각 실험에 25개 화기에 대한 4회 반복 실험결과를 통계값으로 나타내었다. ZnSO<sub>4</sub>의 경우에는 100~800 ppm의 범위에서 모든 화기에서 수정되었을 때를 100%로 기준할 때 70% 이상의 자기화분에 의한 결실율이 확보되었으며, 900 ppm 이상의 농도에서는 화기가 황변하거나 조기에 탈락되는 약해가 일어났다. CuSO<sub>4</sub>의 경우에는 100~700 ppm의 범위에서 모든 화기에서 수정되었을 때를 100%로 기준할 때 70% 이상의 자기화분에 의한 결실율이 확보되었으며 800 ppm 이상의 농도에서는 약해가 일어났다.

## &lt; 실시예 6 후지사과에서 화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리시기 결정 및 결실율 조사

## &lt; 6-1화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리시기 결정

본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제 효과를 실제 포장에서 실험하기 위하여, 연구용 온실(대한민국 경상북도 청송군 소재)에서 재배되고 있는 후지사과에 본 발명의 화주조직-특이적 RNase를 처리하였다. 후지사과는 자연계에서 대표적인 자가불화합성 식물이며 유전적으로 단일품종만을 유지시키는 환경조건을 유지하면서 실험을 수행하였다.

본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제 처리시기를 결정하기 위하여, 화기초기(꽃봉오리 형성기~만개 전), 화기중기(만개시), 화기말기(만개 1일 후~화기 탈락기)에 상기 저해제를 처리하였다. 상기 저해제에 실록세인(siloxane)계 전착제(상품명: 실루엣, 대한민국 동부정밀화학사)를 0.0335%로 혼합한 조성물을 제조하여 상기 실시예 5-1과 동일한 조건에서 실험을 실시한 후 그 결과를 표 5에 나타냈다.

< 표 5

#### 화주조직-특이적 RNase의 저해제가 처리된 후지사과의 화기 형성기별 결실율

[표 5]

개화시기	ZnSO <sub>4</sub> 1 mM 처리시 결실율	CuSO <sub>4</sub> 1 mM 처리시 결실율
초기	개화 5일전	92%
	개화 4일전	93%
	개화 3일전	71%
	개화 2일전	32%
	개화 1일전	0
중기	만개	0
말기	만개 1일 후	0
	만개 2일 후	0

상기 표 5에 정리한 바와 같이 후지사과의 화기형성 초기(만개 3일~5일 전)에 전착제를 혼합한 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제를 처리한 결과 야생종 토마토와 같이 70% 이상의 자기화분에 의한 결실율을 확보할 수 있었다.

< 6-2 화주조직-특이적 RNase의 저해제의 농도 변화에 따른 결실율 및 약해 조사

화주조직-특이적 RNase의 저해제의 농도에 따른 결실율 및 약해를 조사하기 위하여, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제인 ZnSO<sub>4</sub>와 CuSO<sub>4</sub>를 농도별로 후지사과에 만개 4일전에 처리하였다.

또한, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제의 과일 결실 조절제로서의 효능을 극대화시키기 위하여, ZnSO<sub>4</sub> 또는 CuSO<sub>4</sub>에 실록세인(siloxane)계 전착제(상품명: 실루엣, 대한민국 동부정밀화학사)를 0.0335%로 혼합한 조성물을 제조하여 처리하였다.

< 표 6

#### 후지사과에 대한 화주조직-특이적 RNase의 저해제 농도변화에 따른 결실율 및 약해 조사

[표 6]

유효성분 농도 (ppm)	ZnSO <sub>4</sub> 각 농도별 결실율 및 약해 유무		CuSO <sub>4</sub> 각 농도별 결실율 및 약해 유무	
	결실율(%)	약해	결실율(%)	약해
0	0	무	0	무
20	0	무	0	무
40	5	무	0	무
60	17	무	11	무
80	36	무	39	무
100	72	무	70	무
200	79	무	76	무
300	93	무	88	무
400	88	무	85	무
500	85	무	77	무
600	84	무	73	무
700	74	무	73	무
800	70	무	52	미약
900	44	소	31	소
1000	27	소	21	소
1100	9	소	11	소
1200	0	소	0	소
1300	0	소	0	극심
1400	0	극심	0	극심
1500	0	극심	0	극심

상기표 6에 정리한 바와 같이 ZnSO<sub>4</sub>의 경우에는 100~800 ppm의 범위에서 70% 이상의 자기화분에 의한 결실율이 확보되었으며, 900 ppm 이상의 농도에서는 화기가 황변하거나 조기에 탈락되는 약해가 일어났다. CuSO<sub>4</sub>의 경우에는 100~700 ppm의 범위에서 70% 이상의 자기화분에 의한 결실율이 확보되었으며 800 ppm 이상의 농도에서는 역시 약해가 일어났다.

각각의 실험결과는 25개 화기에 대한 4회 반복 실험결과를 통계처리하여 나타냈다.

상기 실시예 5 및 6의 결과로부터, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제는 배우자체형 자가불화합성 식물의 자가불화합성을 종(種)에 관계없이 타파시킬 수 있음이 판명되었다.

#### 발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제인 황산염 특히, CuSO<sub>4</sub> 및 ZnSO<sub>4</sub>를 식물의 개화 초기(꽃봉오리 형성기~만개 전)에 처리함으로써 자가불화합성이 타파되었으며 자기화분에 의해 안정적으로 수정 및 결실이 유도되었다. 따라서, 본 발명의 화주조직-특이적 RNase의 저해제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 자가불화합성 식물인 사과, 배, 커피, 아몬드 등의 과수류에 적정농도로 처리함으로써 별도의 수분수를 재배하지 않고도 자기화분에 의해 수정된 과실 및 식물을 획득할 수 있다. 또한, 방화곤충의 도움 없이도 높은 결실율을 확보할 수 있으므로 단위면적 당 생산량을 극대화할 수 있는 혁신적인 재배방법을 제공한다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

##### 삭제

##### 청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

화주조직-특이적 RNase의 활성을 저해하는  $Cu^{2+}$  이온이 결합된 무기염 60 내지 700 ppm 또는  $Zn^{2+}$  이온이 결합된 무기염 40 내지 800 ppm을 개화기에 식물에 살포함으로써 식물의 자가불화합성을 조절하는 방법.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

제 4항에 있어서, 상기  $Cu^{2+}$  이온이 결합된 무기염 또는  $Zn^{2+}$  이온이 결합된 무기염의 음이온은 황산, 질산, 과염소산, 과브롬산, 과요오드산, 염산, 브롬산 및 요오드산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 강산의 음이온인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 상기  $Cu^{2+}$  이온이 결합된 무기염 또는  $Zn^{2+}$  이온이 결합된 무기염의 음이온은 황산의 음이온인 것을 특징으로 하는 방법.

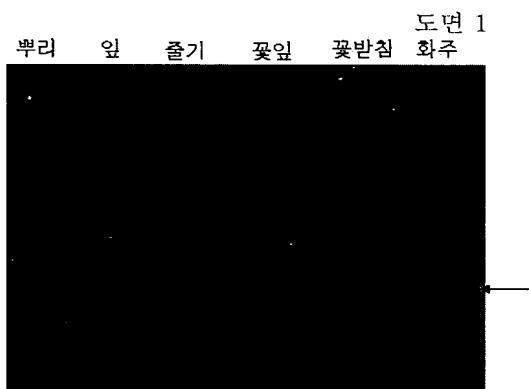
청구항 17.

제 4항에 있어서, 상기  $Cu^{2+}$  이온이 결합된 무기염 또는  $Zn^{2+}$  이온이 결합된 무기염을 0.0335 내지 0.05%의 헥사코나졸계(hexaconazole), 실록세인계(siloxane) 및 알킬아릴 폴리에톡실산계(alkylaryl polyethoxylate)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전착제와 혼합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.

제 4항에 있어서, 상기 식물은 사과, 배, 커피 및 아몬드를 포함하는 과수류 또는 화훼류, 약용식물, 토마토, 가지, 담배, 감자를 포함하는 가지과 채소로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

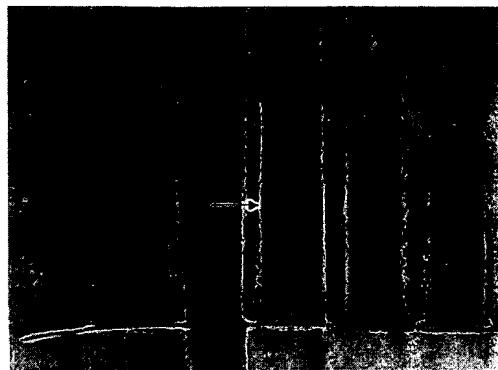
도면



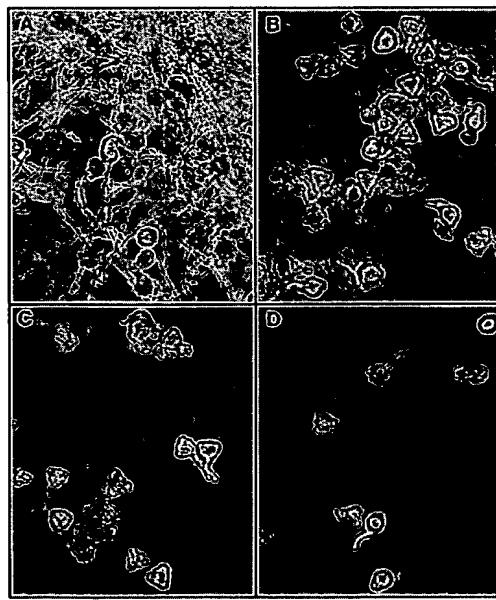
BEST AVAILABLE COPY

도면 2

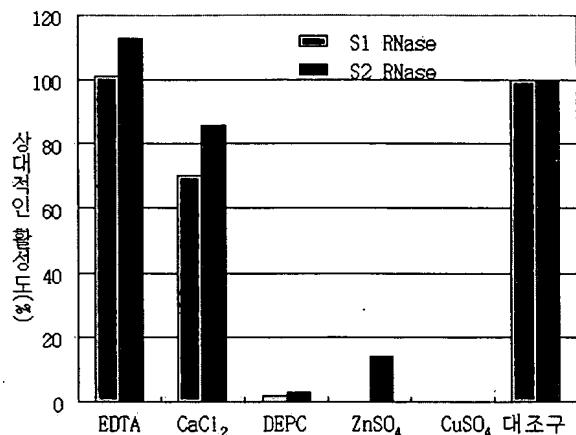
W 흥로 흥옥 후지 국광 쓰가루



도면 3

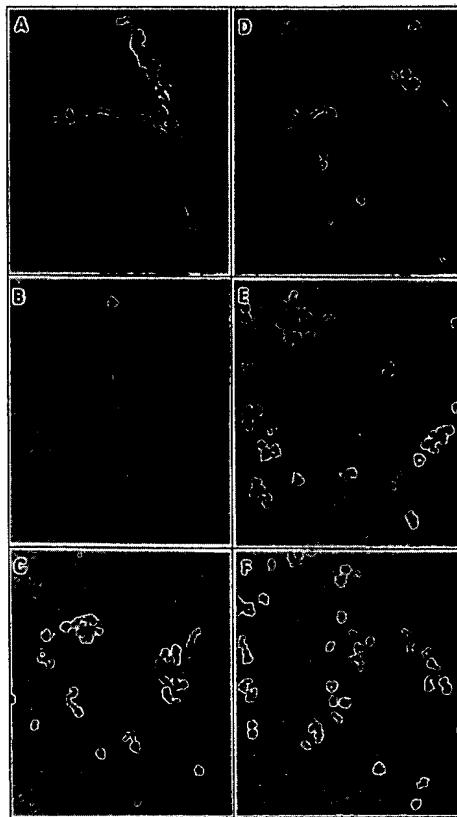


도면 4



BEST AVAILABLE COPY

도면 5



**BEST AVAILABLE COPY**

도면 6a

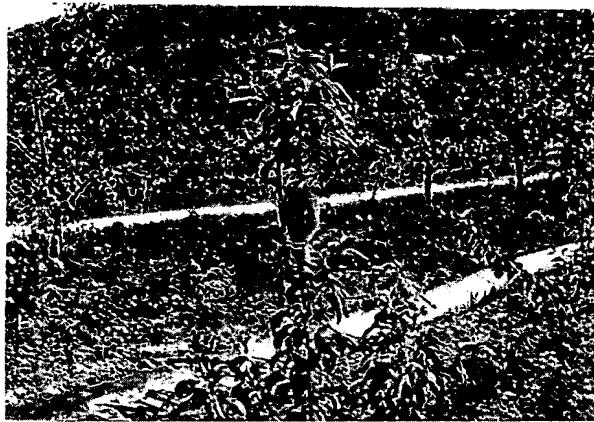


도면 6b



BEST AVAILABLE COPY

도면 7a



도면 7b



**BEST AVAILABLE COPY**